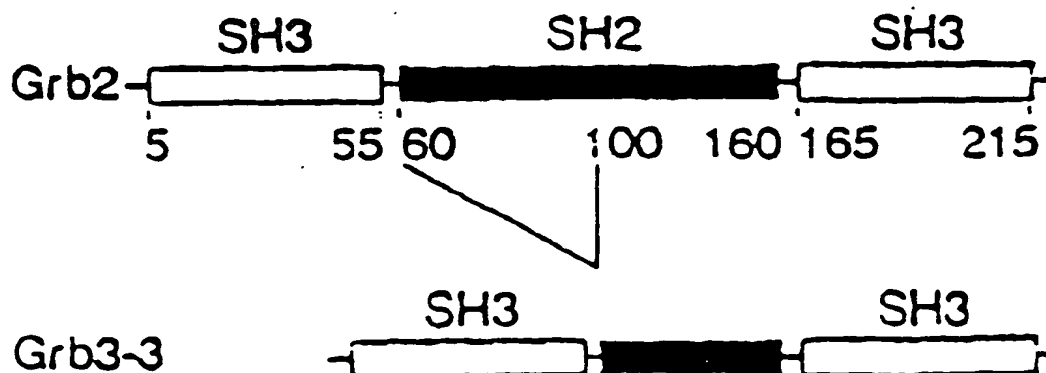


**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/12, A61K 48/00</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 95/07981</b> (43) Date de publication internationale: <b>23 mars 1995 (23.03.95)</b>
(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR94/00542</b> (22) Date de dépôt international: <b>9 mai 1994 (09.05.94)</b> (30) Données relatives à la priorité: <b>93/10971 15 septembre 1993 (15.09.93) FR</b> (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): <b>RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</b> (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): <b>SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 53, boulevard de la Libération, F-94300 Vincennes (FR). TOCQUE, Bruno [FR/FR]; 259, boulevard Péreire, F-75017 Paris (FR).</b> (74) Mandataire: <b>BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</b>			(81) Etats désignés: <b>AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</b>  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>

(54) Title: **GRB3-3 GENE, VARIANTS AND USES THEREOF**(54) Titre: **GENE GRB3-3, SES VARIANTS ET LEURS UTILISATIONS**

## (57) Abstract

Novel gene known as Grb3-3, variants thereof and use especially in anti-cancer gene therapy.

## (57) Abrégé

La présente invention concerne un nouveau gène, désigné Grb3-3, ses variants et leurs utilisations, notamment en thérapie génique anti-cancéreuse.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

### GENE GRB3-3, SES VARIANTS ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention concerne un nouveau gène, désigné Grb3-3, ses variants, et leurs utilisations, notamment en thérapie génique anti-cancéreuse.

Différents gènes, appelés oncogènes et gènes suppresseurs, sont impliqués dans le contrôle de la division cellulaire. Parmi ceux-ci, les gènes ras, et leurs produits généralement désignés protéines p21, jouent un rôle clé dans le contrôle de la prolifération cellulaire chez tous les organismes eucaryotes où ils ont été recherchés. Notamment, il a été montré que certaines modifications spécifiques de ces protéines leur font perdre leur contrôle normal et les conduisent à devenir oncogénique. Ainsi, un grand nombre de tumeurs humaines a été associé à la présence de gènes ras modifiés. De même, une surexpression de ces protéines p21 peut conduire à un dérèglement de la prolifération cellulaire. La compréhension du rôle exact de ces protéines p21 dans les cellules, de leur mode de fonctionnement et de leurs caractéristiques constitue donc un enjeu majeur pour la compréhension et l'approche thérapeutique de la cancérogénèse.

Différents facteurs impliqués dans la voie de signalisation ras dépendante ont été identifiés. Parmi ceux-ci figure le gène Grb2, qui code pour une protéine de 23-25 kDa ayant une structure SH3-SH2-SH3 (Lowenstein et al., Cell 70 (1992) 431; Matuoka et al., PNAS 89 (1992) 9015). Le produit du gène Grb2 semble interagir avec les protéines tyrosine phosphorylées, par son domaine SH2, et avec un facteur d'échange du GDP de la classe SOS, par son domaine SH3 (Egan et al., Nature 363 (1993) 45). Il serait ainsi l'un des composants de l'activité transformante du produit du gène ras. La présente invention découle de la mise en évidence, du clonage et de la caractérisation d'un isoforme du gène Grb2, désigné Grb3-3, possédant une délétion dans le domaine SH2. Ce gène est exprimé dans les tissus adultes : l'ARNm correspondant est présent sous une bande unique de 1,5 kb, et est traduit en une protéine de 19 kDa. En raison de sa délétion dans le domaine SH2, le produit du gène Grb3-3 n'est plus capable d'interagir avec les protéines tyrosine phosphorylées (récepteur EGF phosphorylé), mais il conserve la capacité d'interagir avec les domaines riche en proline des protéines SOS. En raison de sa délétion, le produit du gène Grb3-3 est ainsi capable de s'opposer aux effets cellulaires du produit du gène Grb2. Le transfert de ce gène in vivo, ou de variants de celui-ci, y compris de

séquences antisens, permet donc d'interférer avec les processus de prolifération, de différenciation et/ou de mort cellulaire.

Un premier objet de l'invention concerne donc une séquence nucléotidique comprenant tout ou partie du gène Grb3-3 (séquence SEQ ID n° 1).

- 5           Un autre objet de l'invention concerne une séquence nucléotidique dérivée de la séquence SEQ ID n° 1 et capable d'inhiber au moins en partie l'expression de la protéine Grb2 ou Grb3-3. En particulier, l'invention concerne les séquences antisens, dont l'expression dans une cellule cible permet de contrôler la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule
- 10           cible, en ARN complémentaires des ARNm cellulaires Grb2 ou Grb3-3 et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. De telles séquences peuvent être constituées par tout ou partie de la séquence nucléiques SEQ ID n° 1, transcrites dans l'orientation inverse.

- Comme indiqué ci-avant, Grb2 est une protéine au moins bi-fonctionnelle,
- 15           s'ancrant par son domaine SH2 à des séquences particulières phosphorylées en tyrosine, et, par ses deux domaines SH3, aux facteurs d'échange de la famille SOS. Grb3-3 ayant perdu sa capacité à s'associer à des protéines phosphorylées en tyrosine peut donc uniquement former un complexe avec les protéines SOS. Grb3-3 peut donc s'opposer au recrutement du complexe Grb2-SOS par les récepteurs des facteurs de
- 20           croissance autophosphorylés ou par des protéines associées également phosphorylées en tyrosine telles que SHC ou IRS1. Grb3-3 étant capable de bloquer ce recrutement, il est capable de bloquer des voies mitogènes et d'induire la mort cellulaire. La demanderesse a en effet démontré que la protéine Grb3-3 était exprimée au cours de certains processus physiologiques comme par exemple la maturation du thymus chez
- 25           le rat. La demanderesse a également montré que Grb3-3 est capable d'induire la mort cellulaire par apoptose de différents types cellulaires. Ces propriétés tout à fait avantageuses ont pu être mises en évidence (i) par injection de la proréine recombinante dans les fibroblastes 3T3 et (ii) par par transfert de la séquence codant pour Grb3-3 dans les cellules 3T3 (exemple 4). Grb3-3 est donc capable d'induire la
- 30           mort cellulaire de cellules viables telles que des cellules immortalisées, cancéreuses ou embryonnaires. Comme montré dans les exemples, Grb2 est capable de s'opposer aux effets de Grb3-3.

Par ailleurs, une recherche de l'expression de Grb3-3 réalisée au cours de l'infection de cellules lymphocytaires par le virus HIV a permis de montrer que la production virale massive observée 7 jours après l'infection est corrélée avec une surexpression de l'ARNm de Grb3-3 par les cellules infectées (exemple 5). Cette expérience montre que éliminer ou contrecarrer les effets cellulaires de Grb3-3 peut également permettre de maintenir en vie des cellules infectées, notamment par le VIH, et ainsi, permettre aux lymphocytes T4 de continuer à remplir un rôle de défense immunitaire. A cet égard, l'invention concerne également l'utilisation de composés capables d'éliminer ou de contrecarrer au moins partiellement les effets cellulaires de Grb3-3 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée traitement du Sida. Plus particulièrement, les composés utilisés peuvent être :

- des séquences antisens génétiques telles que définies ci-dessus,
- des oligonucléotides spécifiques de Grb3-3, modifiés ou non pour une meilleure stabilité ou biodisponibilité (phosphorothioates, agents intercalants, etc). Il peut s'agir de préférence d'oligonucléotides recouvrant la séquence codante localisée entre le domaine SH3 N-terminal et le domaine SH2 résiduel.
- toute séquence dont le transfert dans les cellules infectées induit une surexpression de Grb2.

Les séquences nucléiques selon l'invention peuvent être utilisées telles quelles, par exemple après injection à l'homme ou l'animal, pour induire une protection ou traiter les cancers. En particulier, elles peuvent être injectées sous forme d'ADN nu selon la technique décrite dans la demande WO 90/11092. Elles peuvent également être administrées sous forme complexée, par exemple avec du DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), avec des lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), sous forme de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc.

Préférentiellement, les séquences nucléiques selon l'invention font partie d'un vecteur. L'emploi d'un tel vecteur permet en effet d'améliorer l'administration de l'acide nucléique dans les cellules à traiter, et également d'augmenter sa stabilité dans lesdites cellules, ce qui permet d'obtenir un effet thérapeutique durable. De plus, il est possible d'introduire plusieurs séquences d'acide nucléique dans un même vecteur, ce qui augmente également l'efficacité du traitement.

Le vecteur utilisé peut être d'origine diverse, dès lors qu'il est capable de transformer les cellules animales, de préférence les cellules tumorales humaines. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, on utilise un vecteur viral, qui peut être choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés (AAV), le virus de l'herpès, le cytomégalovirus (CMV), le virus de la vaccine, etc. Des vecteurs dérivés des adénovirus, des rétrovirus, ou des AAV incorporant des séquences d'acides nucléiques hétérologues ont été décrits dans la littérature [Akli et al., Nature Genetics 3 (1993) 224 ; Stratford-Perricaudet et al., Human Gene Therapy 1 (1990) 241 ; EP 185 573, Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Le Gal la Salle et al., Science 259 (1993) 988 ; Roemer et Friedmann, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211 ; Dobson et al., Neuron 5 (1990) 353 ; Chiocca et al., New Biol. 2 (1990) 739 ; Miyano-hara et al., New Biol. 4 (1992) 238 ; WO91/18088].

La présente invention concerne donc également tout virus recombinant comprenant, insérée dans son génome, une séquence nucléique telle que définie avant.

Avantageusement, le virus recombinant selon l'invention est un virus défectif. Le terme "virus défectif" désigne un virus incapable de se répliquer dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la répllication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par l'acide nucléique de l'invention. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Il est particulièrement avantageux d'utiliser les séquences nucléiques de l'invention sous forme incorporée à un adénovirus, un AAV ou un rétrovirus recombinant défectif.

Concernant les adénovirus, il en existe différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Par ailleurs, ces virus ne s'intègrent pas dans le génome des cellules qu'ils infectent, et peuvent incorporer des fragments importants d'ADN exogène. Parmi les différents sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5). Dans le cas des adénovirus Ad 5, les séquences nécessaires à la répllication sont les régions E1A et E1B.

Les virus recombinants défectifs de l'invention peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un virus défectif et un plasmide portant entre autre la séquence nucléotidique telle que définie ci-avant (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Graham, EMBO J. 3(12) (1984) 2917). La recombinaison homologue se produit après

5 co-transfection desdits virus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome du virus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation d'adénovirus

10 recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation de rétrovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée CRIP (Danos et Mulligan, PNAS 85 (1988) 6460).

15 Ensuite, les virus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant au moins un virus recombinant ou une séquence nucléotidique tels que définis ci-dessus.

20 Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc.

Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable,

25 éventuellement directement dans la tumeur à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

30 Les doses d'acides nucléiques (séquence ou vecteur) utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, de l'acide nucléique à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une

manière générale, concernant les virus recombinants selon l'invention, ceux-ci sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

De telles compositions pharmaceutiques peuvent être utilisées chez l'homme, pour le traitement et/ou la prévention des cancers. En particulier, les produits de l'invention étant capables de moduler l'activité des protéines ras, ils permettent d'intervenir dans le processus de développement des cancers, et notamment, ils peuvent inhiber l'activité des oncogènes dont l'activité transformante passe par une interaction p21-GAP fonctionnelle. De nombreux cancers ont en effet été associés à la présence de protéines ras oncogéniques. Parmi les cancers renfermant le plus souvent des gènes ras mutés, on peut citer notamment les adénocarcinomes du pancréas, dont 90 % ont un oncogène Ki-ras muté sur le douzième codon (Almoguera et coll., Cell 53 (1988) 549), les adénocarcinomes du colon et les cancers de la thyroïde (50 %), ou les carcinomes du poumon et les leucémies myéloïdes (30 %, Bos, J.L. Cancer Res. 49 (1989) 4682). Plus généralement, les compositions selon l'invention peuvent être utilisées pour traiter tout type de pathologie dans lesquelles une prolifération cellulaire anormale est observée, par induction de l'apoptose, ainsi que toute pathologie caractérisée par une mort cellulaire par apoptose (sida, chorée de Huntington, Parkinson), au moyen de composés bloquant les effets de Grb3-3 (antisens notamment).

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### Légende des Figures

- Figure 1 : Représentation schématique des domaines structuraux de Grb2 et Grb3-3.  
Figure 2 : Etude de la liaison de Grb3-3 au récepteur à l'EGF (figure 2a) et à des peptides riches en proline (figure 2b).  
Figure 3 : Effet de Grb3-3 sur la transactivation par ras d'un RRE dérivé de l'enhancer du virus du polyome.



Figure 4 : Mise en évidence de la mort cellulaire induite par Grb3-3 sur les fibroblastes 3T3.

Figure 5 : Mise en évidence de l'expression de Grb3-3 dans les cellules infectées par le virus HIV.

## 5 Techniques Générales de Biologie Moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au  
10 phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 ; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current  
15 Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un  
20 mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence  
25 de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13  
30 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être

effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

## **EXEMPLES**

### **1. Isolement du gène Grb3-3**

Le gène Grb3-3 a été isolé par criblage d'une banque d'ADN humain au moyen d'une sonde dérivée de la séquence du gène Grb2.

500 000 phages recombinants Lambda gt11 portant des fragments d'ADN issus d'une banque de placenta humaine (Clontech) ont été criblés au moyen d'une sonde dérivée de la séquence du gène Grb2. La sonde utilisée correspond aux 8 premiers acides aminés de la protéine Grb2, et possède la séquence suivante :

ATGGAAGCCATCGCCAAATATGAC (SEQ ID n° 2)

10 clones positifs ont ainsi été identifiés. L'insert de ces 10 clones a été isolé sous forme de fragments EcoRI, cloné dans le plasmide M13mp18 et séquencé. Parmi ces 10 clones, 9 portaient des inserts identiques à la séquence Grb2. Un seul d'entre eux portait un insert d'une taille inférieure au gène Grb2, en raison d'une délétion dans le domaine SH2 (Figure 1). L'analyse de la séquence restante a révélé une identité parfaite avec les régions correspondantes de Grb2, y compris dans les régions 5' et 3' non codantes. La phase de lecture ouverte de ce clone code pour une protéine de 177 acides aminés (SEQ ID n° 1), comprenant 2 domaines SH3 bordant un domaine SH2 incomplet (figure 1). Les acides aminés délétés dans le domaine SH2 (résidus 60 à 100 de la protéine Grb2) correspondent aux résidus impliqués dans la liaison de Grb2 aux peptides contenant des tyrosines phosphorylées.

### **2. Activité de liaison de la protéine Grb3-3**

Comme indiqué plus haut, la protéine Grb2 est le médiateur de l'interaction entre les récepteurs de facteurs de croissance phosphorylés et les facteurs SOS. Cet exemple démontre que la protéine Grb3-3 est incapable d'interagir avec le récepteur à l'EGF phosphorylé, mais qu'elle conserve sa faculté d'interagir avec un peptide riche en proline dérivé de la séquence du facteur SOS1 humain.

La capacité de liaison de Grb3-3 a été étudiée en utilisant des protéines de fusion à la Glutathion-S-Transférase (GST), biotinylées. Ce type de fusion permet une purification rapide et efficace des produits recombinants. Pour cela, les séquences de l'invention ont été exprimées dans la souche d'*E.coli* TG1 sous forme de protéines de fusion avec la GST selon la technique décrite par Smith et Johnson [Gene 67 (1988) 31]. Brièvement, les gènes Grb2 et Grb3-3 ont tout d'abord été modifiés par introduction de part et d'autre des codons start et stop d'un site BamHI. Pour cela, les phases ouvertes de lecture de ces gènes ont été amplifiées par PCR au moyen des oligonucléotides suivants :

10 Oligonucléotide I (5') (SEQ ID n° 3) :  
GAATTTCGGATCCATGGAAGCCATCGCCAAATATGACTTC

Oligonucléotide II (3') (SEQ ID n° 4) :  
GAATTTCGGATCCTTAGACGTTCCGGTTCACGGGGGTGAC

15 La partie soulignée correspond au site BamHI crée, suivi ou précédé des codons start et stop.

Les gènes ainsi amplifiés ont ensuite été clonés sous forme de fragments BamHI dans le vecteur pGEX 2T (Pharmacia) linéarisé par le même enzyme, en 3' et en phase d'un ADNc codant pour la GST. Les vecteurs ainsi obtenus ont ensuite été utilisés pour transformer la souche *E.coli* TG1. Les cellules ainsi transformées ont été précultivées une nuit à 37°C, diluées au 1/10e dans du milieu LB, ajoutées d'IPTG pour induire l'expression (2 heures, 25°C), puis cultivées 21 heures environ à 25°C. Les cellules ont ensuite été lysées, et les protéines de fusions produites purifiées par affinité sur colonne Agarose-GSH. Pour cela, le lysat bactérien est incubé en présence du gel (préparé et équilibré avec le tampon de lyse) pendant 15 minutes à 4°C. Après 3 lavages avec un tampon Tris-HCl pH 7,4, les protéines sont éluées en présence d'un tampon Tris-HCl pH 7,7 contenant un excès de GST. Le surnageant est récolté et centrifugé.

30 Le même protocole a été utilisé pour préparer un mutant de Grb2 dans lequel la glycine 203 est remplacée par une arginine (Grb2G203R) et un mutant de Grb3-3 dans lequel la glycine 162 est remplacée par une arginine (Grb3-3G162R). Le mutant Grb2G203R a été décrit comme n'ayant plus d'activité dans un test de réinitiation de la synthèse d'ADN (Lowenstein et al précitée). Le mutant Grb3-3G162R porte la même mutation sur la même position, et devrait donc également être inactif.

Ces mutants ont été préparés par mutagenèse par PCR sur les gènes Grb2 et Grb3-3 en utilisant, en 5', l'oligonucléotide I décrit ci-dessus, et en 3', l'oligonucléotide III suivant sur lequel le codon muté est souligné :

Oligonucléotide III (3') (SEQ ID n° 5) :

5 GACGTTCCGGTTCACGGGGGTGACATAATTGCGGGGAAACATGCGGGTC

Les fragments ainsi amplifiés ont ensuite été élués, réamplifiés par PCR au moyen des oligonucléotides I et II, puis clonés dans le vecteur pGEX 2T. Les mutants ont ensuite été produits comme décrit ci-dessus.

10 Les protéines de fusion à la GST (GST-Grb2, GST-Grb3-3, GST-Grb3-3G162R et la GST) ont ensuite été biotinylées par les techniques classiques connues de l'homme du métier (Cf techniques générales de biologie moléculaire ainsi que Mayer et al., PNAS 88 (1991) 627), et utilisées comme sondes pour déterminer la liaison au récepteur à l'EGF phosphorylé immobilisé (2.1.) puis à un peptide dérivé de hSOS1 (2.2.).

#### 15 2.1. Liaison au récepteur EGF phosphorylé

Protocole : Le récepteur à l'EGF utilisé a été purifié à partir de cellules A431 par immobilisation sur WGA-sépharose selon la technique décrite par Duchesne et al. (Science 259 (1993) 525). 2 µg de ce récepteur ont d'abord été stimulés par 1 µM EGF, 10 min. à 22°C, puis incubés, avec ou sans ATP froid (10 µM), en présence de  
20 2,5 mM MnCl<sub>2</sub> dans un tampon HNTG (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton, 10 % Glycérol, pH=7,5) à 4°C pendant 2 min. La phosphorylation du récepteur est ensuite stoppée par addition d'un tampon de dégradation. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE 4-20 % puis transférés sur des membranes de polyvinylidène difluorure (PVDF). Les blots ont ensuite été incubés en présence des  
25 différentes fusions GST biotinylées (2 µg/ml), puis révélés au moyen de streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (Promega). Les récepteurs EGF ont également été soumis à un immunoblot en présence d'anticorps anti-phosphotyrosines (anti--PY) pour vérifier que les récepteurs ont bien été phosphorylés.

30 Résultats : Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2a. Ils montrent, comme attendu, que la protéine Grb2 interagit avec le récepteur EGF sous forme phosphorylée seulement. Ils montrent ensuite que la protéine Grb3-3 ne lie pas le récepteur EGF, quel que soit son degré de phosphorylation.

## 2.2. Liaison à un peptide dérivé de hSOS1

Protocole : Les deux peptides riches en proline suivants ont été synthétisés :

Peptide hSOS1 : GTPEVPVPPPVPPRRRPESA : Ce peptide correspond aux résidus 1143 à 1162 de la protéine hSOS1 (Li et al., Nature 363 (1993) 83), responsable de l'interaction entre Grb2 et hSOS1 (SEQ ID n° 6).

Peptide 3BP1 : PPPLPPLV : Ce peptide est dérivé de la protéine 3BP1, qui est connue pour lier de manière efficace le domaine SH3 de Abl et Src (Cicchetti et al., Science 257 (1992) 803) (SEQ ID n° 7).

Chacun de ces peptides (1 µl, 10 mg/ml) a été immobilisé sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été incubées dans un tampon bloquant (Tris 20 mM pH=7,6, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween, 3 % albumine bovine). Les membranes ont ensuite été incubées une nuit à 4°C en présence des différentes fusions GST biotinylées (4 µg/ml), puis révélées au moyen de streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (Promega)

Résultats : Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2b. Ils montrent que Grb3-3, comme Grb2, est capable de lier le peptide hSOS1. Ils montrent de plus que cette interaction est spécifique puisqu'aucune liaison n'est observée avec le peptide 3BP1. Par ailleurs, les résultats montrent également que le mutant Grb3-3G162R n'est plus capable de lier le peptide hSOS1, ce qui confirme l'importance de ce résidu et le rôle fonctionnel de cette interaction.

## 3. Activité de la protéine Grb3-3

Cet exemple démontre que, en dépit de sa délétion dans le domaine SH2, la protéine Grb3-3 possède un effet fonctionnel.

L'activité de la protéine Grb3-3 a été étudiée par détermination de sa capacité à coopérer avec ras pour la transactivation d'un promoteur possédant des éléments de réponse à ras (RRE), et gouvernant l'expression d'un gène reporteur.

Le protocole utilisé a été décrit par exemple dans Schweighoffer et al., Science 256 (1992) 825. Brièvement, le promoteur utilisé est un promoteur synthétique composé du promoteur murin du gène de la thymidine kinase et de 4 éléments PEA1 répétés dérivés de l'enhancer du polyôme (Wasylyk et al., EMBO J. 7 (1988) 2475) : promoteur Py-TK. Ce promoteur dirige l'expression du gène reporteur,

en l'occurrence du gène bactérien de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) : vecteur Py-TK-CAT. Les vecteurs d'expression des gènes testés ont été construits par insertion desdits gènes, sous forme de fragments BamHI, au site BglII du plasmide pSV2. Ce site permet de placer les gènes sous contrôle du promoteur précoce SV40.

- 5 Des cellules ER22 à 40% de confluence ont été transfectées avec 0,5 µg du vecteur Py-TK-CAT seul (Py) ou en présence de du vecteur d'expression portant, sous contrôle du promoteur précoce de SV40, le gène : Grb2, 2 µg, Grb3-3, 2 µg, Grb2(G203R) 2 µg, Grb3-3(G162R) 2 µg, ou Grb3-3, 2 µg + Grb2, 2 µg. Dans  
10 chaque cas, la quantité totale d'ADN a été ajustée à 5 µg avec un vecteur d'expression sans insert. La transfection a été effectuée en présence de lipospermine (Transfectam, IBF-Sepracor). Les cellules ont été maintenues 48 heures en culture dans un milieu DMEM supplémenté par 0,5 % serum de veau fœtal. L'activité CAT (transactivation du RRE) a ensuite été déterminée comme décrit par Wasylyk et al (PNAS 85 (1988) 7952).
- 15 Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3. Ils montrent clairement que l'expression de la protéine Grb3-3 s'oppose aux effets de l'activation d'un récepteur à facteur de croissance. Ils montrent également que Grb2 en excès s'oppose aux effets de Grb3-3 sur la réponse au facteur de croissance.

#### 4. Grb3-3 induit l'apoptose cellulaire

- 20 Cet exemple démontre l'implication directe de Grb3-3 dans l'apoptose cellulaire. Cette propriété offre des applications particulièrement avantageuses pour le traitement des pathologies résultant d'une prolifération cellulaire (cancers, resténose, etc).

- 25 L'induction de l'apoptose cellulaire par Grb3-3 a été démontrée (i) par injection de la protéine recombinante dans les fibroblastes 3T3 et (ii) par par transfert de la séquence codant pour Grb3-3 dans les cellules 3T3.

##### (i) Injection de la protéine recombinante

- 30 La protéine Grb3-3 recombinante a été préparée sous forme de protéine de fusion avec la GST selon le protocole décrit dans l'exemple 2. La protéine de fusion a ensuite été traitée par la thrombine (0,25%, Sigma) pour séparer la partie GST, puis purifiée par chromatographie d'échange d'ions sur colone monoQ. Les fractions

contenant la protéine recombinante ont ensuite été concentrées au moyen de microconcentrateurs Microsep (Filtron) dans un tampon phosphate 20 mM (pH 7) contenant 100 mM NaCl. La protéine purifiée ainsi obtenue a été injectée (1 à 3 mg/ml) à des cellules 3T3 en culture au moyen d'un microinjecteur automatique  
5 Eppendorf. Les cellules ont ensuite été incubées à 34°C et photographiées à intervalles réguliers pour suivre les transformations morphologiques. Les résultats obtenus montrent que 5 heures après l'injection de Grb3-3 la majeure partie des cellules sont mortes alors que l'injection dans les mêmes conditions de Grb2 ou du mutant Grb3-3 (G162R) n'a aucun effet sur la viabilité des cellules.

10 (ii) Transfert de la séquence codant pour la protéine recombinante

Un plasmide a été construit comprenant la séquence SEQ ID n° 1 codant pour la protéine Grb3-3 sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40.

Les fibroblastes 3T3 à 40 % de confluence ont été transfectés en présence de lipospermine (Transfectam, IBF-Sepracor) avec 0,5 ou 2 µg de ce plasmide  
15 d'expression. 48 heures après la transfection, 50% des cellules étaient en suspension dans le milieu, et les cellules restantes, adhérant à la paroi, présentaient des changements morphologiques très importants (figure 4). Une analyse par électrophorèse en gel d'agarose a montré par ailleurs que les cellules présentaient un  
20 pattern de fragmentation d'ADN oligo-nucléosomal caractéristique des cellules mortes (figure 4). En revanche, les cellules transfectées dans les mêmes conditions par un plasmide d'expression de Grb2, Grb3-3 (G162R) ou Grb2 (G203R) conservent une morphologie normale, sont toujours viables et ne présentent aucune fragmentation d'ADN. Comme le montre la figure 4, la co-expression de Grb2 permet de s'opposer aux effets de Grb3-3.

25 Ces résultats montrent donc clairement que Grb3-3 constitue un gène tueur capable d'induire l'apoptose cellulaire. Comme indiqué ci-avant, cette propriété offre des applications particulièrement avantageuses pour le traitement des pathologies résultant d'une prolifération cellulaire telles que notamment les cancers, la resténose, etc.

30 5. Mise en évidence de l'expression de Grb3-3 dans les lymphocytes infectés par le virus HIV.

Cet exemple montre que, au cours du cycle d'infection des lymphocytes T par le virus HIV, la proportion relative des ARNm de Grb2 et Grb3-3 est modifiée, et que le messenger de Grb3-3 est surexprimé au moment de la production virale massive et de la mort cellulaire.

- 5 Des lymphocytes du sang périphérique ont été infectés par le virus HIV-1 à deux dilutions (1/10 et 1/100) pendant 1, 4 ou 7 jours. Les ARNm des cellules ont ensuite été analysés par reverse-PCR au moyen d'oligonucléotides spécifiques de Grb2 et Grb3-3 pour déterminer la proportion relative des messagers de Grb2 et Grb3-3. Les oligonucléotides spécifiques de Grb3-3 utilisés sont les suivants :

- 10 Oligonucléotide IV (3') : ATCGTTTCCAAACGGATGTGGTTT (SEQ ID n° 8)  
Oligonucléotide V (5') : ATAGAAATGAAACCACATCCGTTT (SEQ ID n° 9)

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 5. Ils montrent clairement que 7 jours après l'infection par le virus HIV, l'ARNm de Grb3-3 est surexprimé. Comme montré par dosage de la protéine p24 et de la transcriptase inverse du virus, le

- 15 jour 7 correspond également à la période à laquelle une production virale massive est observée.





16

	40	45	50	
5	ATG AAA CCA CAT CCG TTT GGA AAC GAT GTG CAG CAC TTC AAG GTG CTC Met Lys Pro His Pro Phe Gly Asn Asp Val Gln His Phe Lys Val Leu 55 60 65 70			246
10	CGA GAT GGA GCC GGG AAG TAC TTC CTC TGG GTG GTG AAG TTC AAT TCT Arg Asp Gly Ala Gly Lys Tyr Phe Leu Trp Val Val Lys Phe Asn Ser 75 80 85			294
15	TTG AAT GAG CTG GTG GAT TAT CAC AGA TCT ACA TCT GTC TCC AGA AAC Leu Asn Glu Leu Val Asp Tyr His Arg Ser Thr Ser Val Ser Arg Asn 90 95 100			342
20	CAG CAG ATA TTC CTG CGG GAC ATA GAA CAG GTG CCA CAG CAG CCG ACA Gln Gln Ile Phe Leu Arg Asp Ile Glu Gln Val Pro Gln Gln Pro Thr 105 110 115			390
25	TAC GTC CAG GCC CTC TTT GAC TTT GAT CCC CAG GAG GAT GGA GAG CTG Tyr Val Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asp Pro Gln Glu Asp Gly Glu Leu 120 125 130			438
30	GGC TTC CGC CGG GGA GAT TTT ATC CAT GTC ATG GAT AAC TCA GAC CCC Gly Phe Arg Arg Gly Asp Phe Ile His Val Met Asp Asn Ser Asp Pro 135 140 145 150			486
35	AAC TGG TGG AAA GGA GCT TGC CAC GGG CAG ACC GGC ATG TTT CCC CGC Asn Trp Trp Lys Gly Ala Cys His Gly Gln Thr Gly Met Phe Pro Arg 155 160 165			534
40	AAT TAT GTC ACC CCC GTG AAC CGG AAC GTC TAAGAGTCAA GAAGCAATTA Asn Tyr Val Thr Pro Val Asn Arg Asn Val 170 175			584
45	TTTAAAGAAA GTGAAAAATG TAAAACACAT ACAAAGAAT TAAACCCACA AGCTGCCTCT GACAGCAGCC TGTGAGGGAG TGCAGAACAC CTGCCGGGTC ACCCTGTGAC CCTCTCACTT TGGTTGGAAC TTTAGGGGGT GGGAGGGGGC GTTGGATTTA AAAATGCCAA AACTTACCTA TAAATTAAGA AGAGTTTTTA TTACAAATTT TCACTGCTGC TCCTCTTTCC CCTCCTTTGT CTTTTTTTTC TTCCTTTTTT CTCTTCTGTC CATCAGTGCA TGACGTTTAA GGCCACGTAT AGTCCTAGCT GACGCCAATA AAAACAAGA AACCAAAAAA CCCGAATTC			644 704 764 824 884 933

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- 50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC  
 (vi) ORIGINE:  
 (A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATGGAAGCCA TCGCCAAATA TGAC

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 39 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(vi) ORIGINE:  
(A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE I
- 10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:  
GAATTCGGAT CCATGGAAGC CATCGCCAAA TATGACTTC 39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- 15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 39 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 20 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(vi) ORIGINE:  
(A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE II
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:  
GAATTCGGAT CCTTAGACGT TCCGGTTCAC GGGGGTGAC 39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 49 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(vi) ORIGINE:  
(A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE III
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:  
GACGTTCCGG TTCACGGGGG TGACATAATT GCGGGGAAAC ATGCGGGTC 49

35 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 20 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 40 (ii) TYPE DE MOLECULE: Protéine  
(vi) ORIGINE:  
(A) ORGANISME: Peptide hSOS1 (résidus 1143 à 1162)

18

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Gly Thr Pro Glu Val Pro Val Pro Pro Pro Val Pro Pro Arg Arg Arg

1 5 10 15

Pro Glu Ser Ala

5 20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 10 (A) LONGUEUR: 8 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Protéine

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Peptide 3BP1

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Pro Pro Pro Leu Pro Pro Leu Val

1 5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE IV

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

ATCGTTTCCA AACGGATGTG GTTT

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE V

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:  
ATAGAAATGA AACCACATCC GTTT

24

### REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1.
2. Séquence nucléotidique dérivée de la séquence SEQ ID n° 1 et capable d'inhiber au moins en partie l'expression de la protéine Grb2 ou Grb3-3.
3. Vecteur comprenant une séquence nucléotidique selon les revendications 1 ou 2.
4. Vecteur selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.
5. Vecteur selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur dérivé des adénovirus, des rétrovirus, des AAV, du virus HSV, CMV ou du virus de la vaccine.
6. Vecteur selon les revendications 4 ou 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus déficient pour la réplication.
7. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs vecteurs selon l'une des revendications 3 à 6.
8. Composition pharmaceutique comprenant une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon les revendications 1 ou 2, sous forme complexée à du DEAE-dextran, à des protéines nucléaires ou à des lipides, sous forme brute ou encore incorporée à des liposomes.
9. Utilisation d'une séquence selon la revendication 1 ou 2 ou d'un vecteur contenant ladite séquence pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.
10. Utilisation d'un composé capable d'éliminer ou de contrecarrer au moins partiellement les effets cellulaires de Grb3-3 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement du Sida.



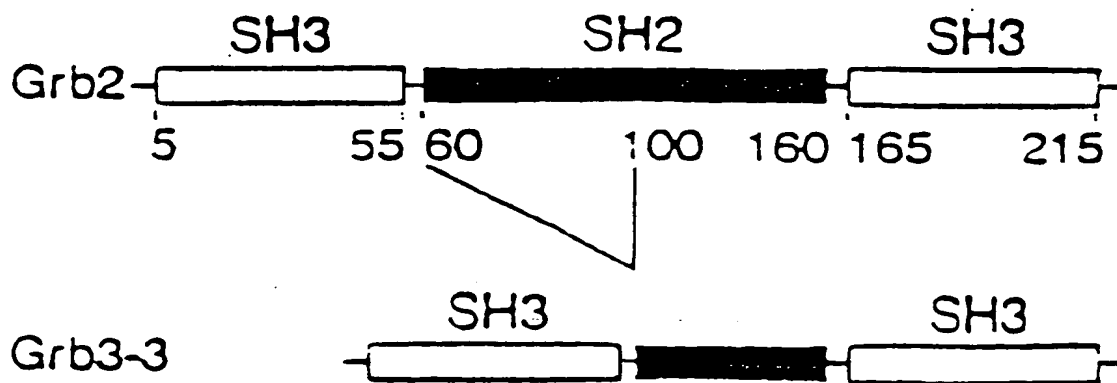


Figure 1.





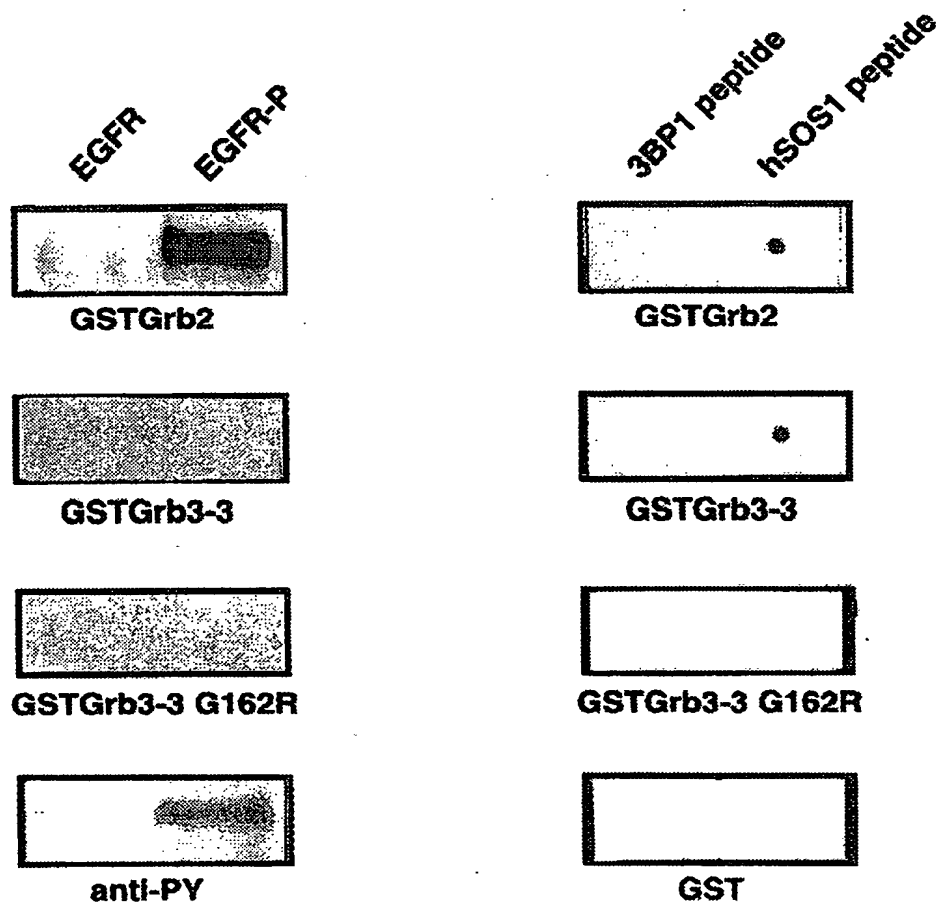


Figure 2



3/5

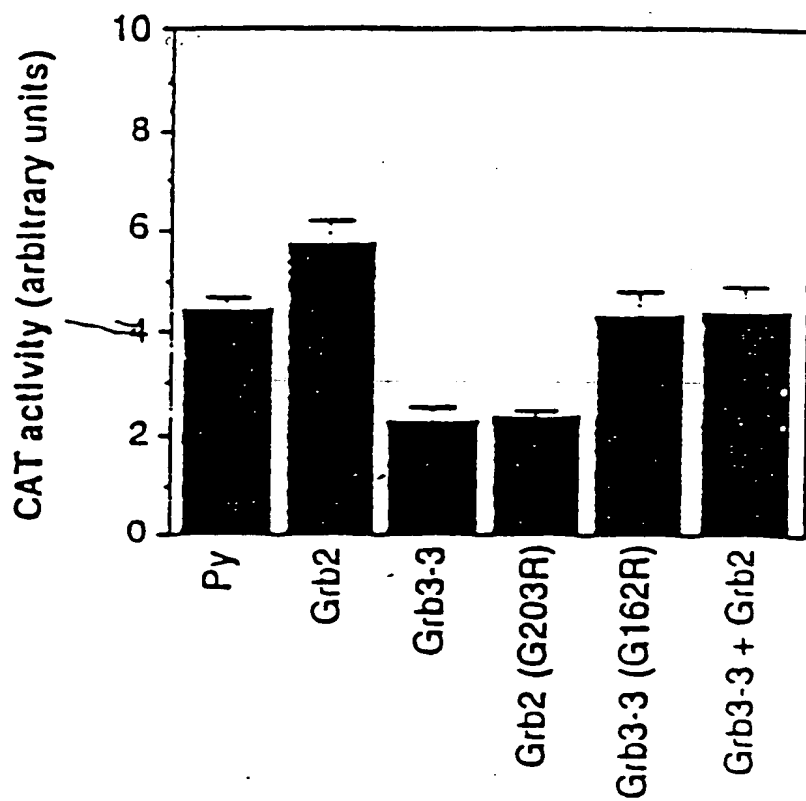
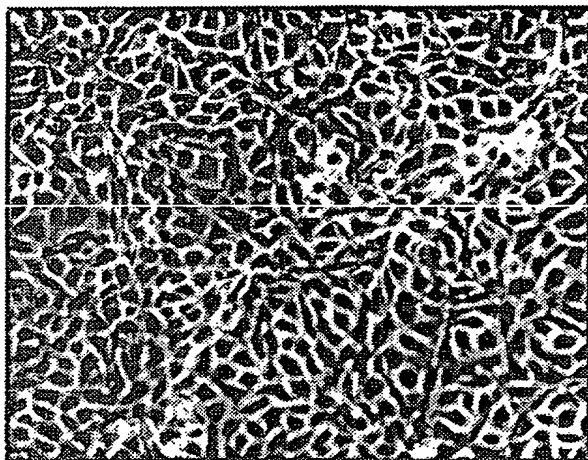
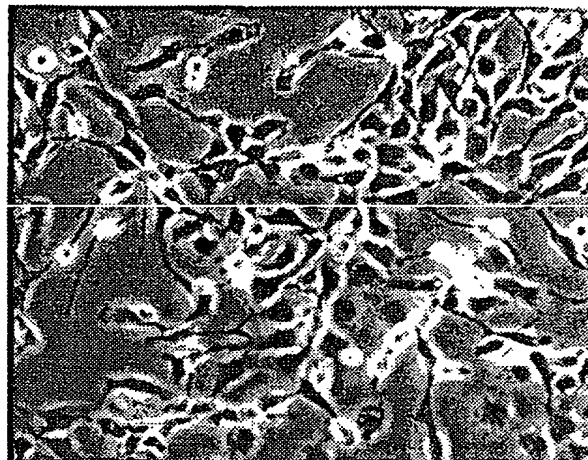


Figure 3





NIH3T3



+Grb3-3

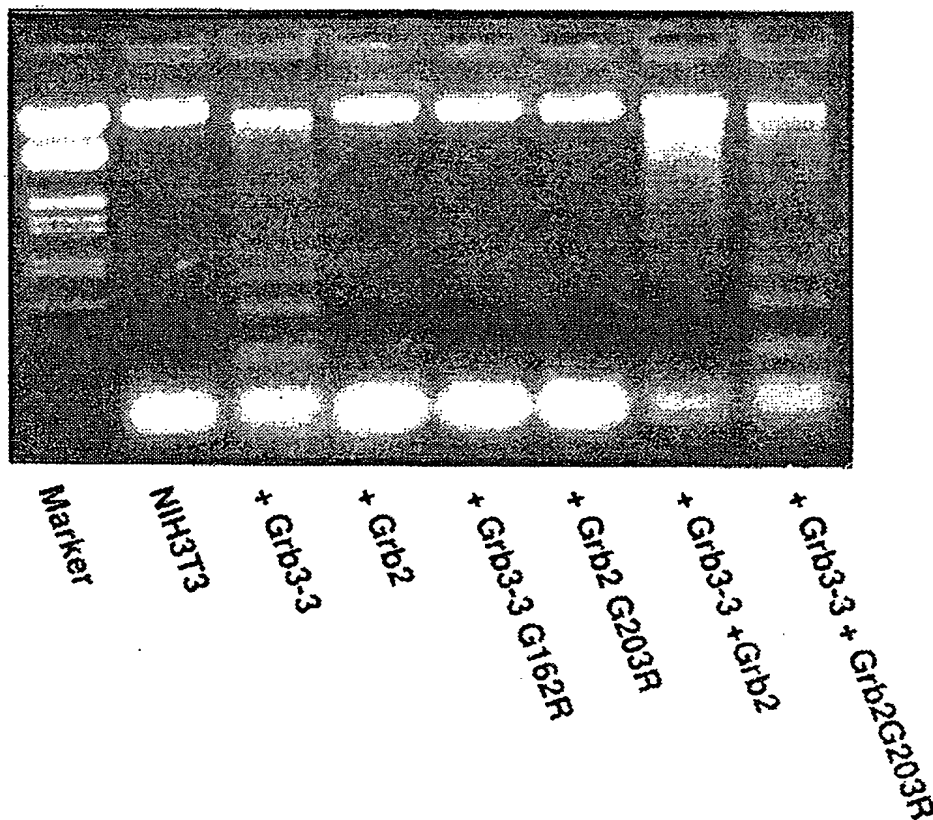


Figure 4



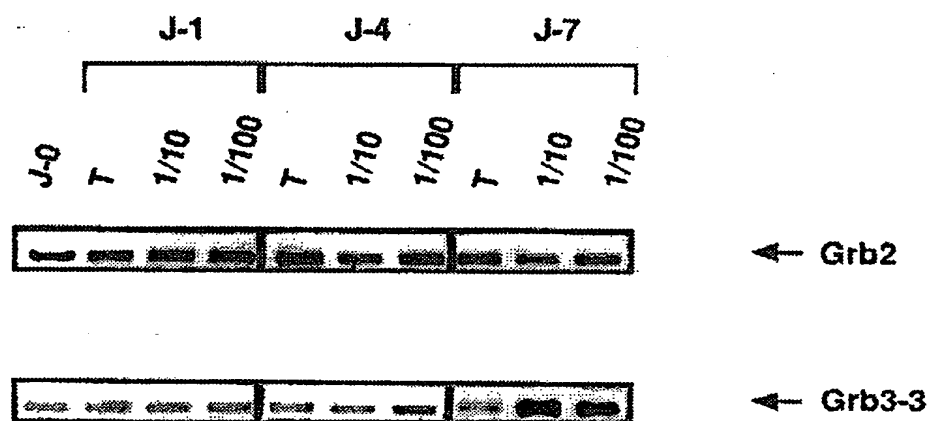


Figure 5





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No

PCT/FR 94/00542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 C12N15/12 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	SCIENCE vol. 264, no. 5161 , 13 May 1994 , LANCASTER, PA US pages 971 - 974 FATH, I. ET AL. 'Cloning of a Grb2 isoform with apoptotic properties' see the whole document ---	1
A	NATURE. vol. 363 , 6 May 1993 , LONDON GB pages 45 - 51 EGAN, S.E. ET AL. 'Association of SOS Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation' cited in the application see the whole document --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 September 1994

Date of mailing of the international search report

27. 09. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CELL. vol. 70 , 1992 , CAMBRIDGE, MA US pages 431 - 442 LOWENSTEIN, E.J. ET AL. 'The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling' cited in the application see the whole document ---</p>	1
A	<p>SCIENCE vol. 259, no. 5094 , 22 January 1993 , LANCASTER, PA US pages 525 - 528 DUCHESNE, M. ET AL. 'Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling' see the whole document ---</p>	1
A	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 13 , 1993 pages 5500 - 5512 SUEN, K. ET AL. 'Molecular cloning of the mouse Grb2 gene : differential interaction of the Grb2 adaptor protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptor' cited in the application see the whole document ---</p>	1
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 89 , 1992 , WASHINGTON US pages 9015 - 9019 MATUOKA, K. ET AL. see the whole document ---</p>	1
T	<p>WO,A,94 07913 (WARNER LAMBERT CO.) 14 April 1994 see the whole document -----</p>	1

### Information on patent family members

**PCT/FR 94/00542**

**Patent document  
cited in search report**

Publication date

**Patent family member(s)**

Publication date

**WO-A-9407913**

14-04-94

**AU-B-**

**5136093**

**26-04-94**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. e Internationale No

PCT/FR 94/00542

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/12 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	SCIENCE vol. 264, no. 5161, 13 Mai 1994, LANCASTER, PA US pages 971 - 974 FATH, I. ET AL. 'Cloning of a Grb2 isoform with apoptotic properties' voir le document en entier ---	1
A	NATURE. vol. 363, 6 Mai 1993, LONDON GB pages 45 - 51 EGAN, S.E. ET AL. 'Association of SOS Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation' cité dans la demande voir le document en entier --- -/--	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 Septembre 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27. 09. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CELL. vol. 70 , 1992 , CAMBRIDGE, MA US pages 431 - 442 LOWENSTEIN, E.J. ET AL. 'The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling' cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>SCIENCE vol. 259, no. 5094 , 22 Janvier 1993 , LANCASTER, PA US pages 525 - 528 DUCHESNE, M. ET AL. 'Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling' voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 13 , 1993 pages 5500 - 5512 SUEN, K. ET AL. 'Molecular cloning of the mouse Grb2 gene : differential interaction of the Grb2 adaptor protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptor' cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 89 , 1992 , WASHINGTON US pages 9015 - 9019 MATUOKA, K. ET AL. voir le document en entier ---</p>	1
T	<p>WO,A,94 07913 (WARNER LAMBERT CO.) 14 Avril 1994 voir le document en entier -----</p>	1

### Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

**PCT/FR 94/00542**

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)